



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0049702
(43) 공개일자 2024년04월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0793 (2010.01) A61K 35/30 (2015.01)
A61P 25/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0619 (2013.01)
A61K 35/30 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0128493
(22) 출원일자 2022년10월07일
심사청구일자 2022년10월07일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
전진평
서울특별시 은평구 진관3로 15-45 1018동 402호
김중태
강원도 춘천시 춘천로255번길 6, 302호(후평동)
윤동혁
충청북도 단양군 어상천면 어상천로 1589-8
(74) 대리인
특허법인본

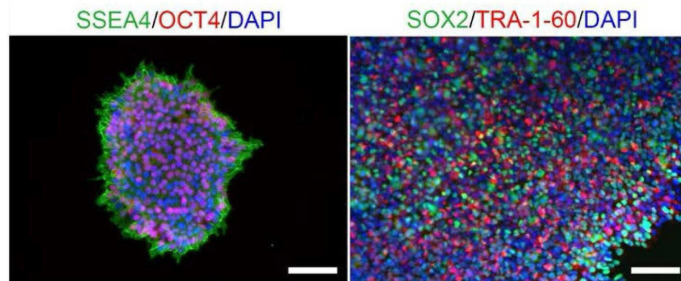
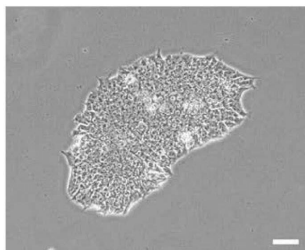
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 뇌손상 치료를 위한 뇌 오가노이드 제조방법

(57) 요약

본 발명은 만능줄기세포를 이용하여 3차원 배양으로 뇌 오가노이드를 만들고, 경도 외상성 뇌손상 치료의 신경복구 효율을 극대화할 수 있는 최적의 배양기간 및 이식 시기를 제공하는 것을 목적으로 한다. 본 발명은, 배아줄기세포 표지자 양성인 배아줄기세포를 수득하는 단계; 상기 수득된 세포를 단일 세포 형태로 배지에 현탁 및 1차 배양하는 단계; 해파린을 포함하는 배지에서 부유 상태로 2차 배양하는 단계; 세포 외 기질에서 3차 배양하는 단계; 및 교반 조건에서 배지의 양을 증가시키며 4차 배양하는 단계; 를 포함하는, 신경조직 오가노이드의 제조방법을 제공한다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61P 25/00 (2018.01)
C12N 2500/32 (2013.01)
C12N 2501/91 (2013.01)
C12N 2506/02 (2013.01)
C12N 2533/52 (2013.01)
C12N 2533/54 (2013.01)
C12N 2533/90 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345346926
과제번호	2020R1I1A3070726
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축
연구과제명	마이토파지 조절기전에 근거한 지주막하 출혈 후 뇌손상 규명 및 나노기반 미토콘드리아 표적 치료 기술 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	한림대학교
연구기간	2022.03.01 ~ 2023.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

신경조직 오가노이드의 제조 방법으로,
배아줄기세포 표지자 양성인 배아줄기 세포를 수득하는 단계;
상기 수득된 세포를 단일 세포 형태로 배지에 현탁 및 1차 배양하는 단계;
헤파린을 포함하는 배지에서 부유 상태로 2차 배양하는 단계;
세포 외 기질에서 3차 배양하는 단계; 및
교반 조건에서 배지의 양을 증가시키며 4차 배양하는 단계;
를 포함하는,
신경조직 오가노이드의 제조 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,
상기 배아줄기세포 표지자는 SOX2, OCT4, SSEA4 및 TRA-1-60인 것인,
신경조직 오가노이드의 제조 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,
상기 신경조직 오가노이드는 SOX2, nestin, FOXG1, PAX6, DCX, TUJ1 및 Ki67을 발현하는 것인,
신경조직 오가노이드의 제조 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,
상기 현탁 및 1차 배양하는 단계는,
혈청 배지; L-글루타민 대체 제공 배지; 항산화제; 및 ROCK 억제제;
를 포함하는 배지에서 진행되는 것인,
신경조직 오가노이드의 제조 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,
상기 2차 배양하는 단계는,
N2 보충제(N2 supplement); 및 L-글루타민 대체 제공 배지;

를 포함하는 배지에서 진행되는 것인,
신경조직 오가노이드의 제조 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,
상기 세포 외 기질은 라미닌 및 콜라겐이 포함된 것인,
신경조직 오가노이드의 제조 방법.

청구항 7

제1항에 있어서,
상기 3차 배양하는 단계는,
N2 보충제(N2 supplement); L-글루타민 대체 제공 배지; 인슐린; 항산화제; 및 비타민 A가 포함되지 않은 B27 보충제;
를 포함하는 배지에서 진행되는 것인,
신경조직 오가노이드의 제조 방법.

청구항 8

제1항에 있어서,
상기 교반은 60rpm 내지 100rpm의 속도로 수행되는 것인,
신경조직 오가노이드의 제조 방법.

청구항 9

제1항에 있어서,
상기 4차 배양하는 단계는,
신경기저 배지; N2 보충제(N2 supplement); L-글루타민 대체 제공 배지; 인슐린; 항산화제; 비타민 A가 포함되지 않은 B27 보충제; 및 완충제;
를 포함하는 배지에서 진행되는 것인,
신경조직 오가노이드의 제조 방법.

청구항 10

제1항에 있어서,
상기 4차 배양하는 단계는, 30일 내지 100일 동안 수행되는 것인,
신경조직 오가노이드의 제조 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 제조 방법에 의해 제조되는, 신경조직오가노이드.

청구항 12

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 제조 방법에 의해 제조되는 신경조직 오가노이드를 포함하는, 뇌손상 치료용 약학적 조성물.

청구항 13

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 제조 방법에 의해 제조되는 신경조직 오가노이드를 포함하는, 신경세포 손상을 치료하기 위한 세포 치료제.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 뇌손상 치료를 위한 뇌 오가노이드 제조방법에 관한 것으로, 구체적으로는 특정 배아줄기세포 표지자에 대해 양성인 배아줄기세포를 이용하는 뇌 오가노이드 제조 방법을 제공하는 것이다.

배경 기술

[0002] 현재 외상성 뇌손상을 위한 세포치료제는 개발되지 않았으며, 뇌졸중을 대상으로 골수, 제대혈에서 유래한 중간엽줄기세포(mesenchymal stem cells, MSC)가 많이 시도되고 있으나, 이는 내재된 신경세포의 기능을 돕고 신경 영양 보조(neurotrophic support), 염증조절(immunomodulation) 및 혈관생성(angiogenesis)이 주된 기전으로, 손상된 신경세포의 직접적인 대체효과는 아니다.

[0003] 하지만, 최근 사람과 설치류의 뇌조직에서도 항상성 유지 및 신경손상이 발행한 경우 신경 생성(neurogenesis)에 의한 재생의 증거들이 확인되고 있으며, 어린 아이의 뇌 속 해마에서 새로운 신경이 생성된다고 보고되고 있다.

[0004] 기존의 연구는 침습적인 방법에 의해 물리적, 화학적 방법을 이용하여 뇌의 치아이랑(dentate gyrus)의 과립하영역(subgranular zone, SGZ)과 측뇌실(lateral ventricle)의 뇌실하영역(subventricular zone, SVZ)에 존재하는 전구세포를 분리 배양하여 신경세포로 분화를 유도하였으나, 치료효과를 얻기 위한 충분한 신경줄기세포의 확보에 많은 어려움이 있었다.

[0005] 특히 기존의 연구는 물리적, 화학적 방법을 이용하여 뇌조직에서 신경줄기세포를 분리 배양하는 방법이었으나, 뇌 조직 질량에 비례하여 1회에 분리되는 세포의 수율에 한계가 있어, 효율적인 신경줄기세포 배양 방법의 제도가 필요하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) Lancaster MA, Knoblich JA. Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells. Nat Protoc. 2014;9:2329-2340.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 또한, 본 발명이 해결하고자 하는 과제들은 이상에서 언급된 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른

과제들은 아래의 기재로부터 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

[0009] 본 발명은 상기한 실정을 고려하여 만능줄기세포를 이용하여 3차원 배양으로 신경조직, 특히 뇌에 대한 오가노이드를 만들고, 경도 외상성 뇌손상 치료의 신경복구 효율을 극대화할 수 있는 최적의 배양기간 및 이식 시기를 제공하는 것이다.

[0010] 또한 본 발명은 증식능력이 억제되어 이식 후 종양형성 우려가 없고, 미성숙 뉴런 (immature neuron)을 포함한 뇌 오가노이드를 선별하기 위한 표지자 및 그 기준을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여 본 발명의 일 실시예에 의하면, 신경조직오가노이드의제조방법으로, 배아 줄기세포표지자양성인배아줄기세포를수득하는단계; 상기 수득된 세포를 단일 세포 형태로 배지에 현탁 및 1차 배양하는 단계; 헤파린을 포함하는 배지에서 부유 상태로 2차 배양하는 단계; 세포 외 기질에서 3차 배양하는 단계; 및 교반 조건에서 배지의 양을 증가시키며 4차 배양하는 단계; 를 포함하는, 방법을 제공할 수 있다.

[0012] 또한 본 발명에서, 상기 배아줄기세포 표지자는 SOX2, OCT4, SSEA4 및 TRA-1-60인 것일 수 있다.

[0013] 또한 본 발명에서, 상기 신경조직 오가노이드는 SOX2, nestin, FOXG1, PAX6, DCX, TUJ1 및 Ki67을 발현하는 것일 수 있다.

[0014] 또한 본 발명에서, 상기 현탁 및 1차 배양하는 단계는, 혈청 배지; L-글루타민 대체 제공 배지; 항산화제; 및 ROCK 억제제; 를 포함하는 배지에서 진행되는 것일 수 있다.

[0016] *또한 본 발명에서, 상기 현탁 및 1차 배양하는 단계는 0.1 mL 당 6000개 내지 9000개의 세포 밀도로 배양하는 것일 수 있다.

[0017] 또한 본 발명에서, 상기 2차 배양하는 단계는, N2 보충제; 및 L-글루타민 대체 제공 배지; 를 포함하는 배지에서 진행되는 것일 수 있다.

[0018] 또한 본 발명에서, 상기 세포 외 기질은 라미닌 및 콜라겐이 포함된 것일 수 있다.

[0019] 또한 본 발명에서, 상기 2차 배양하는 단계는, N2 보충제; 및 L-글루타민 대체 제공 배지; 를 포함하는 배지에서 진행되는 것일 수 있다.

[0020] 또한 본 발명에서, 상기 교반은 60rpm 내지 100rpm의 속도로 수행되는 것일 수 있다.

[0021] 또한 본 발명에서, 상기 4차 배양하는 단계는, 신경기저 배지; N2 보충제(N2 supplement); L-글루타민 대체 제공 배지; 인슐린; 2-머캅토에탄올(2-Mercaptoethanol); 비타민 A가 포함되지 않은 B27 보충제; 및 완충제; 를 포함하는 배지에서 진행되는 것일 수 있다.

[0022] 또한 본 발명에서, 상기 4차 배양하는 단계는, 30일 내지 100일 동안 수행되는 것일 수 있다.

[0023] 본 발명의 다른 실시예에 의하면, 본 발명의 제조 방법에 의해 제조되는 신경조직 오가노이드를 제공할 수 있다.

[0024] 본 발명의 또 다른 실시예에 의하면, 본 발명의 신경조직 오가노이드를 포함하는 뇌손상 치료용 약학적 조성물을 제공할 수 있다.

[0025] 본 발명의 또 다른 실시예에 의하면, 본 발명의 신경조직 오가노이드를 포함하는, 신경세포 손상을 치료하기 위한 세포 치료제를 제공할 수 있다.

발명의 효과

[0026] 본 발명의 신경조직 오가노이드는, 뇌손상 치료를 위한 세포치료제로 개발되어 신경 복구 효율을 극대화할 수 있다

[0027] 본 발명의 효과들은 이상에서 언급된 효과로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 효과들은 아래의 기재로부터 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0028] 다양한 양상들이 이제 도면들을 참조로 기재된다. 이하의 실시예에서, 설명 목적을 위해, 다수의 특정 세부사항들이 하나 이상의 양상들의 총체적 이해를 제공하기 위해 제시된다. 그러나, 그러한 양상(들)이 이러한 특정 세부사항들 없이 실시될 수 있음은 명백할 것이다.
- 도 1은 본 발명의 실시예에 있어서 만능줄기세포의 배양사진 및 미분화된 만능줄기세포의 표지자 발현을 나타낸 이미지이다.
- 도 2는 본 발명의 실시예에 있어서 배아체 형성 및 배양 형태를 날짜별로 나타낸 이미지이다.
- 도 3은 본 발명의 실시예에 있어서 배아체의 신경유도 단계의 형태 및 크기 변화를 날짜별로 나타낸 이미지이다.
- 도 4는 본 발명의 실시예에 있어서 신경 상피 분화 단계의 뇌 오가노이드 형태 및 크기 변화를 날짜별로 나타낸 이미지이다.
- 도 5는 본 발명의 실시예에 있어서 배양중인 신경 성숙 분화 단계의 뇌 오가노이드의 크기를 나타낸 이미지이다.
- 도 6은 본 발명의 실시예에 있어서 배양중인 신경 성숙 분화 단계의 뇌 오가노이드의 형태를 나타낸 이미지이다.
- 도 7은 본 발명의 실시예에 있어서 SOX2, FOXG1, PAX6 및 TUJ1 항체를 이용한 6주간 배양한 뇌 오가노이드의 면역형광염색 결과를 나타낸 이미지이다.
- 도 8은 본 발명의 실시예에 있어서 SOX2, PAX6, Ki67 및 nestin 항체를 이용한 6주간 배양한 뇌 오가노이드의 면역형광염색 결과를 나타낸 이미지이다.
- 도 9는 본 발명의 실시예에 있어서 SOX2, Olig2 및 DCX 항체를 이용한 6주간 배양한 뇌 오가노이드의 면역형광염색 결과를 나타낸 이미지이다.
- 도 10은 본 발명의 실시예에 있어서 TUJ1, CTIP2, NeuN, PAX6 및 ki67 항체를 이용한 14주간 배양한 뇌 오가노이드의 면역형광염색 결과를 나타낸 이미지이다.
- 도 11 및 12는 본 발명의 실시예에 있어서 경도 외상성 뇌손상 동물모델에 이식한 뇌 오가노이드가 손상된 뇌 조직을 대체하는 결과를 나타낸 이미지이다.
- 도 13은 본 발명의 실시예에 있어서, 6주, 8주, 14주간 배양한 뇌 오가노이드를 이식후 1주 경과했을 때의 생착율 및 과성장을 비교한 결과를 나타낸 이미지이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0029] 이하, 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여 본 발명에 대하여 상세히 설명하기로 한다. 이에 앞서, 본 명세서 및 특허청구범위에 사용된 용어 또는 단어는 통상적이거나 사전적인 의미로 한정해서 해석되어서는 아니되며, 발명자는 그 자신의 발명을 가장 최선의 방법으로 설명하기 위해 용어의 개념을 적절하게 정의할 수 있다는 원칙에 입각하여 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야만 한다. 따라서, 본 명세서에 기재된 실시예에 기재된 구성은 본 발명의 가장 바람직한 일 실시예에 불과할 뿐이고 본 발명의 기술적 사상을 모두 대변하는 것은 아니므로, 본 출원시점에 있어서 이들을 대체할 수 있는 다양한 균등물과 변형예들이 있을 수 있음을 이해하여야 한다.
- [0030] 한편, 본 명세서에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 명세서에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 출원의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.
- [0032] 본 발명의 일 구현 예에 따르면,
- [0033] 신경조직 오가노이드의 제조 방법으로, 배아줄기세포 표지자 양성인 배아줄기세포를 수득하는 단계; 상기 수득된 세포를 단일 세포 형태로 배지에 현탁 및 1차 배양하는 단계; 핵파괴를 포함하는 배지에서 부유 상태로 2차

배양하는 단계; 세포 외 기질에서 3차 배양하는 단계; 및 교반 조건에서 배지의 양을 증가시키며 4차 배양하는 단계; 를 포함하는, 방법을 제공할 수 있다.

- [0034] 본 발명에서 용어 "오가노이드(organoid)"는 장기유사체라고도 불리며, 성체 줄기 세포(adult stem cell, ASC), 배아 줄기 세포, 유도 만능 줄기 세포(iPSC)로부터 자가 재생 및 자가 조직화를 통해 형성된 3차원 세포 집합체를 의미한다.
- [0035] 본 발명에서, 상기 줄기세포는 간세포 또는 모세포라고도 하며, 배아 또는 성체에 있는, 여러 종류의 조직으로 분화할 수 있는 미분화 세포이고, 전능세포(pluripotent cell)를 지칭한다. 상기 줄기세포는 남성의 생식세포인 정자와 여성의 생식세포인 난자의 수정으로 생성된 수정란에서 유래한 배아줄기세포(Embryonic stem cells), 신체 각 조직에 극히 소량만이 존재하는 성체줄기세포(Adult Stem Cell, Tissue-specific Stem Cell) 또는 유도 만능 줄기세포(Induced Pluripotent Stem Cells; iPSCs)일 수 있고, 바람직하게는 배아줄기세포인 것일 수 있다.
- [0036] 본 발명에서, 상기 배아줄기세포 표지자는 SOX2, OCT4, SSEA4 및 TRA-1-60인 것일 수 있다. 상기 SOX2(SRY-box 2)는 미분화 배아 줄기 세포의 자가 재생 또는 다능성을 유지하는 데 필수적인 전사 인자이다. 상기 OCT4(octamer-binding transcription factor 4)는 POU5F1라고도 하며, 인간에서 POU5F1 유전자에 의해 암호화되는 단백질이며, 미분화 배아 줄기 세포의 자가 재생에 관여한다. 상기 SSEA4(stage-specific embryonic antigen 4) 인간 다능성 세포의 마커로 사용되는 당지질 에피토프이다. 상기 TRA-1-60는 미분화 인간 배아 줄기 세포(ES), 배아 암종 세포(EC) 및 배아 생식 세포(EG) 마커로 사용되는 에피토프로, 세포 분화 시 소실된다. 상기 SOX2, OCT4, SSEA4 및 TRA-1-60를 모두 발현하는 배아줄기세포는 본 발명의 제조 방법에 따라 배양할 경우, 높은 효율로 신경조직 오가노이드, 특히 뇌 오가노이드로 분화할 수 있다.
- [0037] 본 발명에서, 상기 현탁 및 1차 배양하는 단계는, 배아체(embryonic body)를 형성시키는 단계일 수 있다.
- [0038] 본 발명에서, 상기 현탁 및 1차 배양하는 단계는, 혈청 배지; L-글루타민 대체 제공 배지; 항산화제; 및 ROCK 억제제; 를 포함하는 배지에서 진행되는 것일 수 있고, 바람직하게는 DMEM/F12 배지, 녹아웃 혈청 대체(knock out serum replacement, KOSR), 최소 필수 배지-비필수 아미노산(minimum essential media-nonessential amino acids, MEM-NEAA) 및 bFGF를 더 포함할 수 있다. 상기 혈청 배지는 배아줄기세포 고품질 소태아혈청(embryonic stem cell quality fetal bovine serum, hES-quality FBS)일 수 있다. 또한, 상기 L-글루타민 대체 제공 배지는 L-알라닌-L-글루타민(L-alanine-L-glutamine) 디펩타이드를 포함하는 것일 수 있다. 또한, 상기 항산화제는 2-머캅토에탄올(2-Mercaptoethanol)을 포함하는 것일 수 있다.
- [0039] 본 발명에서, 상기 ROCK 억제제는 ROCK 저해제, Rho 키나제 억제제 또는 Rho 관련 단백질 키나제 억제제라고도 하며, AT-13148, BA-210, beta-Elementine, Chroman 1, DJ4, Fasudil, GSK-576371, GSK429286A, H-1152, Hydroxyfasudil, Ibuprofen, LX-7101, Netarsudil, RKI-1447, Ripasudil, TCS-7001, Thiazovivin, Verosudil(AR-12286), Y-27632, Y-30141, Y-33075 및 Y-39983을 포함하는 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것일 수 있으나, ROCK 경로를 억제하는 화합물이라면 제한없이 포함될 수 있다. 또한, 상기 ROCK 억제제는 초기 4일 동안 첨가하는 것일 수 있다.
- [0040] 본 발명에서, 상기 현탁 및 1차 배양하는 단계는 0.1 mL 당 3000개 내지 15000개의 세포 밀도로 배양하는 것일 수 있고, 바람직하게는 상기 현탁 및 1차 배양하는 단계는 0.1 mL 당 6000개 내지 9000개의 세포 밀도로 배양하는 것일 수 있고, 상기 조건에서 부유 배양 효과가 극대화될 수 있다.
- [0041] 상기 배아체(embryonic body)를 형성시키는 단계에서, 상기 현탁 및 1차 배양하는 단계에서 배양된 세포의 직경이 0.3 mm 이상일 때 2차 배양하는 단계로 진행할 수 있다.
- [0043] 본 발명에서, 상기 2차 배양하는 단계는, 신경 분화를 유도시키는 단계일 수 있다.
- [0044] 본 발명에서, 상기 2차 배양하는 단계는, N2 보충제(N2 supplement); 및 L-글루타민 대체 제공 배지; 를 포함하는 배지에서 진행되는 것일 수 있다.
- [0045] 상기 신경 분화를 유도시키는 단계에서, 상기 2차 배양하는 단계에서 배양된 세포의 직경이 0.5 mm 이상일 때 3차 배양하는 단계로 진행할 수 있다.

- [0047] 본 발명에서, 상기 3차 배양하는 단계는, 신경상피(neuroepithelial)를 분화시키는 단계일 수 있다.
- [0048] 본 발명에서, 상기 세포 외 기질은 라미닌 및 콜라겐이 포함된 것일 수 있다.
- [0049] 본 발명에서, 상기 3차 배양하는 단계는, N2 보충제(N2 supplement); L-글루타민 대체 제공 배지; 인슐린; 항산화제; 및 비타민 A가 포함되지 않은 B27 보충제; 를 포함하는 배지에서 진행되는 것일 수 있다.
- [0050] 상기 신경 분화를 유도시키는 단계에서, 상기 3차 배양하는 단계에서 배양된 세포의 직경이 0.7 mm 이상일 때 4차 배양하는 단계로 진행할 수 있다.
- [0052] 본 발명에서, 상기 4차 배양하는 단계는, 신경세포를 성숙시키는 분화를 유도시키는 단계일 수 있다.
- [0053] 본 발명에서, 상기 교반은 60rpm 내지 100rpm의 속도로 수행되는 것일 수 있다.
- [0054] 본 발명에서, 상기 4차 배양하는 단계는, 신경기저 배지; N2 보충제(N2 supplement); L-글루타민 대체 제공 배지; 인슐린; 항산화제; 비타민 A가 포함되지 않은 B27 보충제; 및 완충제; 를 포함하는 배지에서 진행되는 것일 수 있다.
- [0055] 상기 완충제는 일례로, 하이드록시에틸피페라진에테인설폰산(Hydroxyethyl piperazine Ethane Sulfonic acid; HEPES)인 것일 수 있다. 상기 HEPES는 양쪽 이온성 유기 화학적 완충제 중 하나로, 이산화탄소 농도의 변화에도 pH를 유지할 수 있다.
- [0057] 본 발명에서, 1차 내지 4차 배양하는 단계는 모두 30일 이상 120일 이하의 기간 동안 수행되는 것일 수 있고, 바람직하게는 30일 이상 50일 미만의 기간; 50일 이상 90일 미만의 기간; 또는 90일 이상 110일 이하의 기간; 동안 배양하는 것일 수 있다. 특히, 본 발명의 방법에 의해 줄기세포를 50일 이상 배양하는 경우, 손상된 신경세포를 대체할 수 있고 뇌의 신경재생을 촉진하여, 뇌손상 치료를 위한 세포치료제로 개발하는데 있어서 가장 적합할 수 있다.
- [0058] 본 발명에서, 1차 배양하는 단계는 3일 이상 5일 이하의 기간 동안 배양하는 것일 수 있고, 30시간 내지 50시간 마다 배지를 교체하는 것일 수 있다.
- [0059] 본 발명에서, 2차 배양하는 단계는 5일 이상 10일 이하의 기간 동안 배양하는 것일 수 있고, 30시간 내지 50시간 마다 배지를 교체하는 것일 수 있다.
- [0060] 본 발명에서, 3차 배양하는 단계는 3일 이상 7일 이하의 기간 동안 배양하는 것일 수 있고, 30시간 내지 50시간 마다 배지를 교체하는 것일 수 있다.
- [0061] 본 발명에서, 상기 4차 배양하는 단계는, 30일 내지 100일 동안 수행되는 것일 수 있고, 바람직하게는 80일 내지 100일 동안 수행되는 것일 수 있다. 또한, 상기 4차 배양하는 단계에서, 배지 교체는 80시간 내지 110시간 마다 수행하는 것일 수 있다. 또한, 상기 4차 배양하는 단계에서, 최종 배지의 양은 초기 배지의 양보다 1.5배 내지 2.5배의 부피로 보충하는 것일 수 있다. 일례로, 4차 배양 초기 및 중기 2주 동안 20 mL의 최종 분화배지를 사용하여 4일마다 배지를 교체하고, 이후 2주에는 30 mL, 이후 2주에는 40mL로 배지의 양을 증가시켜 배양할 수 있다.
- [0063] 본 발명의 다른 구현 예에 의하면,
- [0064] 본 발명의 제조 방법에 의해 제조되는 신경조직 오가노이드 및 이를 포함하는, 뇌손상의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공할 수 있다. 특히, 상기 뇌손상은 외상성 뇌 손상일 수 있고, 바람직하게는 경도 외상성 뇌 손상일 수 있다.
- [0065] 본 발명에서, "예방"은 본 발명의 약학적 조성물을 이용하여 본 발명에 기재된 질환들의 증상을 차단하거나, 그 증상을 억제 또는 지연시키는 모든 행위라면 제한없이 포함할 수 있다.
- [0066] 본 발명에서, "치료"는 본 발명의 약학적 조성물을 이용하여 상기 열거된 질환들의 증상이 호전 또는 이롭게 변경되는 모든 행위라면 제한없이 포함할 수 있다.

- [0067] 본 발명에서, "약학적 조성물"은 캡슐, 정제, 과립, 주사제, 연고제, 분말 또는 음료 형태임을 특징으로 할 수 있으며, 상기 약학적 조성물은 인간을 대상으로 하는 것을 특징으로 할 수 있다. 상기 약학적 조성물은 이들로 한정되는 것은 아니지만, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 캡슐, 정제, 수성 현탁액 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [0068] 본 발명의 약학적 조성물은 약제적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체는 경구 투여 시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어 용액, 현탁액, 정제, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형할 수 있다.
- [0069] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말디톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충전제, 향응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0070] 본 발명의 약학적 조성물은 사용된 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 정직, 투여시간, 투여경로, 배출율, 약물 배합 및 예방 또는 치료될 특정 질환의 증증을 포함한 여러 요인에 따라 다양하게 변할 수 있고, 상기 약학적 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1일 0.0001mg/kg 내지 50mg/kg 또는 0.001mg/kg 내지 50mg/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 환제, 당의정, 캡슐, 액제, 겔, 시럽, 슬러리, 현탁제로 제형될 수 있고 이들 조성물은 당해 분야의 통상적인 방법에 따라 제조될 수 있다.
- [0071] 본 발명에서 “개체”란, 본 발명이 예방 또는 치료하고자 하는 질환에 대하여 예방 또는 치료가 필요한 개체로서, 포유동물 및 비-포유동물을 모두 포함할 수 있다. 여기서, 상기 포유동물의 예로는 인간, 비-인간 영장류, 예컨대 침팬지, 다른 유인원 또는 원숭이 종; 축산 동물, 예컨대 소, 말, 양, 염소, 돼지; 사육 동물, 예컨대 토끼, 개 또는 고양이; 실험 동물, 예를 들어 설치류, 예컨대 래트, 마우스 또는 기니아 피그 등을 포함할 수 있으나, 본 발명의 목적 상 상기 개체는 인간, 개 또는 고양이일 수 있다.
- [0072] 본 발명에서 “투여”란, 임의의 적절한 방법으로 개체에게 본 발명의 유효성분을 도입하는 과정을 의미하는 것으로서, 본 발명의 상기 치료 방법에서 투여 방법은 피부를 통해 투여될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0073] 본 발명의 목적상, 목적하는 개체에 대한 구체적인 약학적 유효량은 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 경우에 따라 다른 제제가 사용되는지의 여부를 비롯한 구체적 상기 유효성분을 포함하는 조성물, 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 상기 유효성분을 포함하는 조성물의 분비율, 치료기간, 구체적 조성물과 함께 사용되거나 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자와 의학 분야에 잘 알려진 유사 인자에 따라 다르게 적용하는 것이 바람직하다.
- [0074] 본 발명에서, 상기 신경조직 오가노이드를 포함하는 신경세포 손상을 치료하기 위한 세포 치료제를 제공할 수 있고, 상기 세포 치료제란 세포와 조직의 기능을 복원시키기 위하여 살아있는 자가(autologous), 동종(allogenic), 이종(xenogenic) 세포를 체외에서 증식 또는 선별하거나 여타한 방법으로 세포의 생물학적 특성을 변화시키는 등의 일련의 행위를 통하여 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품을 말한다. 이러한 세포 치료제는 크게 두 분야로 분류할 수 있으며 그 첫 번째는 조직재생 혹은 장기기능 회복을 위한 줄기세포 치료제이며, 두 번째는 생체 내 면역반응의 억제 혹은 면역반응의 항진 등 면역반응 조절을 위한 면역 세포 치료제로 분류할 수 있다.
- [0075] 본 발명의 세포 치료제 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 비경구 투여의 경우 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여 및 피내 투여에서 선택된 어느 하나 이상을 제한없이 포함할 수 있다.

[0076] 본 발명에서, 생략된 나머지 기재들은 본 발명의 나머지에서 기재된 바와 마찬가지로 해석될 수 있다.

[0078] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면,

[0079] 시험관 내(in vitro)에서 줄기세포의 SOX2, FOXG1, PAX6, TUJ1, Olig2, DCX, Ki67 및 CTIP2 발현을 증가시키는 방법으로, 상기 방법은:

[0080] 배아줄기세포 표지자 양성인 배아줄기세포를 수득하는 단계; 상기 수득된 세포를 단일 세포 형태로 배지에 현탁 및 1차 배양하는 단계; 해파린을 포함하는 배지에서 부유 상태로 2차 배양하는 단계; 세포 외 기질에서 3차 배양하는 단계; 및 교반 조건에서 배지의 양을 증가시키며 4차 배양하는 단계; 를 포함할 수 있다. 또한, 상기 줄기세포는 nestin의 발현을 증가시키는 것일 수 있다. 상기 마커들은 하기 표 1에서와 같이 나타낼 수 있다.

표 1

순번	마커	서열번호
1	SOX2	서열번호 1
2	nestin	서열번호 2
3	PAX6	서열번호 3
4	DCX	서열번호 4
5	Olig2	서열번호 5
6	TUJ1	서열번호 6
7	CTIP2	서열번호 7
8	FOXG1	서열번호 11
9	Ki67	서열번호 12

[0082]

[0083] 본 발명에서 상기 SOX는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있고, 배아줄기세포 및 신경줄기세포의 유지에 중요한 역할을 하여, 상기 마커를 발현하는 줄기세포의 경우 고품질의 정제된 신경줄기세포인 것을 확인할 수 있다.

[0084] 또한 상기 nestin은 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있고, 축삭의 방사상 성장과 관련된 신경세포에서 주로 발현되는 것으로, 상기 마커를 발현하는 줄기세포의 경우 고품질의 정제된 신경줄기세포인 것을 확인할 수 있다.

[0085] 또한 상기 PAX6은 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있고, 신경 및 표피 조직과 같은 외배엽 조직에서 유래하는 상동 구조의 발달을 위한 마스터 컨트롤 역할을 하는 것으로, 상기 마커를 발현하는 줄기세포의 경우 고품질의 정제된 신경줄기세포인 것을 확인할 수 있다.

[0086] 또한 상기 DCX는 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있고, 신경전구세포 및 미성숙 뉴런에 의해 발현되는 미세소관 관련 단백질로, 상기 마커를 발현하는 줄기세포의 경우 고품질의 정제된 신경줄기세포인 것을 확인할 수 있다.

[0087] 또한 상기 Olig2는 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있고, 뇌와 척수의 제한된 영역에서 발현되는 것으로, 상기 마커가 발현되는 경우 고품질의 정제된 신경줄기세포인 것을 확인할 수 있다.

[0088] 본 발명에서, 생략된 나머지 기재들은 본 발명의 나머지에서 기재된 바와 마찬가지로 해석될 수 있다.

[0090] *

[0091] 이하, 본 발명의 실시예를 통해 본 발명을 더욱 상술하나 하기 실시예에 의해 본 발명이 제한되지 아니함은 자명하다.

[실시예1] 배아체 형성

[0095] 도 1은 본 발명의 실시예에 있어서 만능줄기세포의 배양사진 및 미분화된 만능줄기세포의 표지자 발현을 나타낸 이미지이다.

[0096] 도 2는 본 발명의 실시예에 있어서 배아체 형성 및 배양 형태를 날짜별로 나타낸 이미지이다.

[0097] 도 1 및 도 2의 만능줄기세포를 배양하기 위하여, SOX2, OCT4, SSEA4, TRA-1-60 표지자에 대해 양성인 배아줄기세포를 획득하였다. 이때, 상기 표지자의 서열은 하기 표 2와 같이 나타낼 수 있다.

표 2

순번	마커	서열번호
1	SOX2	서열번호 1
2	OCT4	서열번호 8
3	SSEA4	서열번호 9
4	TRA-1-60	서열번호 10

[0098]

[0099] 본 발명의 범위는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

[0100] 세포를 수거하고, 트립신/EDTA(trypsin/EDTA) 처리 후 단일 세포(single cell) 형태로 만든 다음, 저농도의 bFGF 배지(75% DMEM/F12, 20% 녹아웃 혈청 대체(knock out serum replacement, KOSR), 3% 배아줄기세포 고품질 소태아혈청(embryonic stem cell quality fetal bovine serum, hES-quality FBS), 1% 글루타맥스(GlutaMAX), 1% 최소 필수 배지-비필수 아미노산(minimum essential media-nonessential amino acids, MEM-NEAA), 0.385 μ M 2-머캅토에탄올(2-Mercaptoethanol), 4 ng/mL bFGF) 로 현탁한다. 0.1 mL 당 6000~9000 개의 세포를 바닥에 부착되지 않는 96-웰 둥근 바닥의 초-저 부착 플레이트(ultra-low attachment plate)에서 배양한다. 초기 4일간 50 μ M ROCK 억제제(Y27632)를 첨가하여 배양하고, 2일마다 배지를 교체한다.

[실시예2] 배아체의 신경 유도 단계

[0104] 도 3은 본 발명의 실시예에 있어서 배아체의 신경유도 단계의 형태 및 크기 변화를 날짜별로 나타낸 이미지이다.

[0105] 도 3의 배아체를 배양하기 위하여, 7일간 배양한 배아체는 부유상태를 유지한 채 24-웰 초-저부착 플레이트(24-well ultra-low attachment plate)로 옮긴 후, 97% DMEM/F12, 1% N2 보충제(N2 supplement), 1% 글루타맥스(GlutaMAX), 1% MEM-NEAA, 1 μ g/mL 헤파린(heparin)이 포함된 배지 1 mL 로 2일 마다 배지를 교체하면서 5일간 배양한다.

[0107] [실시예3] 신경 상피 분화 단계

[0109] 도 4는 본 발명의 실시예에 있어서 신경 상피 분화 단계의 뇌 오가노이드 형태 및 크기 변화를 날짜별로 나타낸 이미지이다.

[0110] 도 4의 오가노이드를 배양하기 위하여, 생물학적 안전 캐비닛(Biosafety cabinet)에서 소수성 표면을 가진 파라필름(parafilm)을 5 x 5 cm 크기로 재단 후 100 mm 접시(dish)에 올린 후 1시간동안 자외선 처리하여 준비한다. 5일간 배아체의 신경 유도 후, 직경이 0.5 mm 이상일 때 피펫을 사용하여 조심스럽게 파라필름(parafilm) 위에 올린 후 배지를 최소화한다. 얼음(Ice) 위에서 냉각된 매트릭젤(Matrigel; 콜라겐 및 라미닌을 포함하는 세포 외 기질) 20 μ L를 배아체에 올린 후 인큐베이터에서 30분간 겔화 시킨다. 동량의 DMEM/F12 배지(Medium)와 신경기저 배지(Neurobasal Medium)를 준비하고 0.5% N2 보충제(N2 supplement), 1% 글루타맥스(GlutaMAX), 0.5% MEM-NEAA, 1:4000 (v/v) 인간 인슐린 용액(human insulin solution), 0.1925 μ M 2-머캅토에탄올(2-Mercaptoethanol), 2% 비타민 A가 포함되지 않은 B27 보충제(B27 supplement without vitamin A)가 첨가된 분화배지로 6-웰 초-저부착 플레이트(6-well ultra-low attachment plate)에서 2일마다 배지를 3 mL로 교체하면서 5일간 배양하였다.

[0112] [실시예4] 신경 성숙 분화 단계

[0114] 도 5는 본 발명의 실시예에 있어서 배양중인 신경 성숙 분화 단계의 뇌 오가노이드의 크기를 나타낸 이미지이다.

[0115] 도 6은 본 발명의 실시예에 있어서 배양중인 신경 성숙 분화 단계의 뇌 오가노이드의 형태를 나타낸 이미지이다.

[0116] 도 5 및 도 6의 크기와 형태를 가진 오가노이드를 배양하기 위하여, 5일 후 신경상피세포로 분화된 배아체에서 매트릭젤(Matrigel)로 여러 개의 출아가 형성되면, 동량의 DMEM/F12 Medium 과 신경기저 배지(Neurobasal Medium)를 준비하고 0.5% N2 보충제(N2 supplement), 1% 글루타맥스(GlutaMAX), 0.5% MEM-NEAA, 1:4000 (v/v) 인간 인슐린 용액(human insulin solution), 0.1925 μ M 2-머캅토에탄올(2-Mercaptoethanol), 2% 비타민 A가 포함되지 않은 B27 보충제(B27 supplement with vitamin A), 10mM HEPES 가 첨가된 최종 분화배지 30 mL 로 교체하여 125 mL 삼각 플라스크(Erlenmeyer flask) 로 옮긴다. 다음으로 인큐베이터(Incubator) 내에서 80 rpm 속도로 교반하면서 6주간 배양한다. 배양중초기 2주 동안 20 mL의 최종 분화배지를 사용하여 4일마다 배지를 교체하고, 이후 2주에는 30 mL, 이후 2주에는 40mL로 배지의 양을 증가시켜 배양한다.

[0118] [실시예5] 뇌 오가노이드의 신경분화 평가

[0120] 도 7은 본 발명의 실시예에 있어서 SOX2, FOXG1, PAX6 및 TUJ1 항체를 이용한 6주간 배양한 뇌 오가노이드의 면역형광염색 결과를 나타낸 이미지이다.

[0121] 도 8은 본 발명의 실시예에 있어서 SOX2, PAX6, Ki67 및 nestin 항체를 이용한 6주간 배양한 뇌 오가노이드의 면역형광염색 결과를 나타낸 이미지이다.

[0122] 도 9는 본 발명의 실시예에 있어서 SOX2, Olig2 및 DCX 항체를 이용한 6주간 배양한 뇌 오가노이드의 면역형광염색 결과를 나타낸 이미지이다.

[0123] 도 10은 본 발명의 실시예에 있어서 TUJ1, CTIP2, NeuN, PAX6 및 ki67 항체를 이용한 14주간 배양한 뇌 오가노이드의 면역형광염색 결과를 나타낸 이미지이다.

[0124] 배양중인 뇌 오가노이드 중 일부를 채취하여 1일간 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde)로 고정 및 1일간 30% 수크로오스(sucrose) 처리 후 동결절편을 제작한다. 뇌 오가노이드를 평가하기 위해 신경관(neural tube) 및 측뇌실(lateral ventricle) 유사 구조를 확인할 수 있는 표지자 SOX2, PAX6, FOXG1, nestin, Ki67을 사용하

고, 피질 구조를 확인할 수 있는 표지자 TUJ1, DCX를 사용하여 면역형광 염색을 실시하여 분화정도를 확인하여, 도 7, 도 8, 도 9 및 도 10에서 확인하였다.

[0125] 그 결과, 도 7, 도 8 및 도 9에서 나타난 것처럼, 뇌 오가노이드는 6주간 배양한 경우 미분화세포 및 세포분열이 활발한 세포가 많은 반면, 도 10에 나타난 것처럼, 14 주간 배양한 경우에 세포분열은 감소하고 뉴런으로 분화된 세포가 많은 것을 확인할 수 있었다. 따라서, 14주간 배양한 뇌 오가노이드는 신경줄기세포 및 신경전구세포를 포함하고, 뉴런 세포로 분화가 가능하여 손상된 뇌의 신경을 재생할 가능성이 높은 것을 확인하였다. 또한, 본 발명의 오가노이드는 신경줄기세포 표지자 SOX2, nestin, FOXG1, PAX6 를 발현할 수 있으며, 또한 피질로 분화가 가능한 초기 뉴런 세포의 표지자 DCX, TUJ1를 발현할 수 있는 것을 확인하였다.

[0127] **[실시예6] 경도 외상성 뇌손상 치료 효과를 위한 뇌 오가노이드 이식**

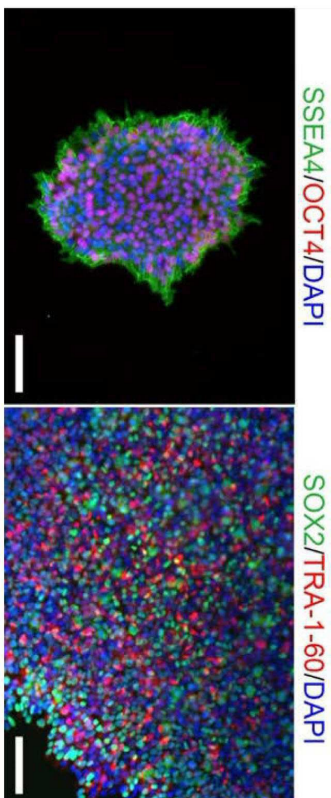
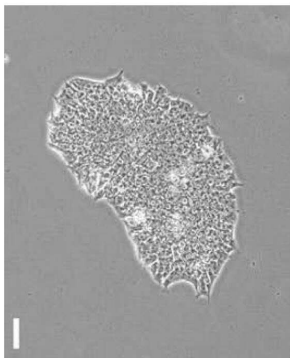
[0129] 도 11 및 12는 본 발명의 실시예에 있어서 경도 외상성 뇌손상 동물모델에 이식한 뇌 오가노이드가 손상된 뇌 조직을 대체하는 결과를 나타낸 이미지이다.

[0130] 마우스를 이용하여 경도 외상성 뇌손상 모델을 제작하고, 뇌 오가노이드를 이식한 다음 1주 및 2주 뒤 이식한 뇌 오가노이드의 뇌손상 치료 효과를 확인하여 도 11 및 12에 나타내었다. 또한, 도 13에서 6주, 8주, 14주간 배양한 뇌 오가노이드를 이식후 1주 경과했을 때의 생착율 및 과성장을 비교하였을 때, 6주에서는 과성장이 관찰되었고, 14주에는 생착율이 낮은 것을 확인하였다. 그 결과, 8주간 배양된 뇌 오가노이드는 경도 외상성 뇌손상 동물모델에 이식하였을 때, 손상된 신경세포를 대체할 수 있고 뇌의 신경재생을 촉진하는 것으로 볼 때, 뇌손상 치료를 위한 세포치료제로 개발하는데 있어서 가장 적합한 뇌 오가노이드의 배양기간으로 적용될 수 있다.

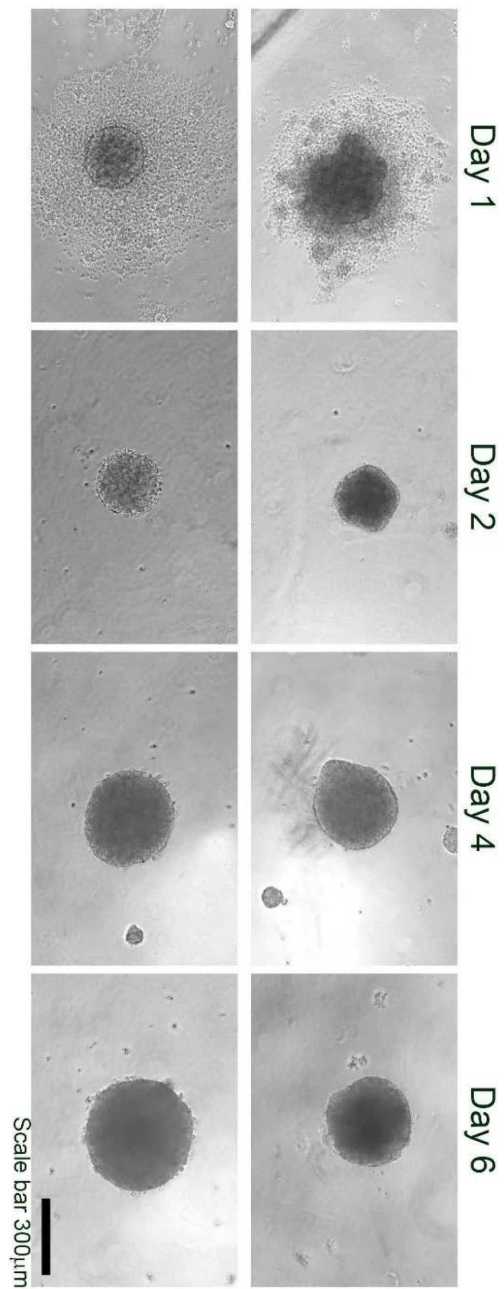
[0132] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

도면

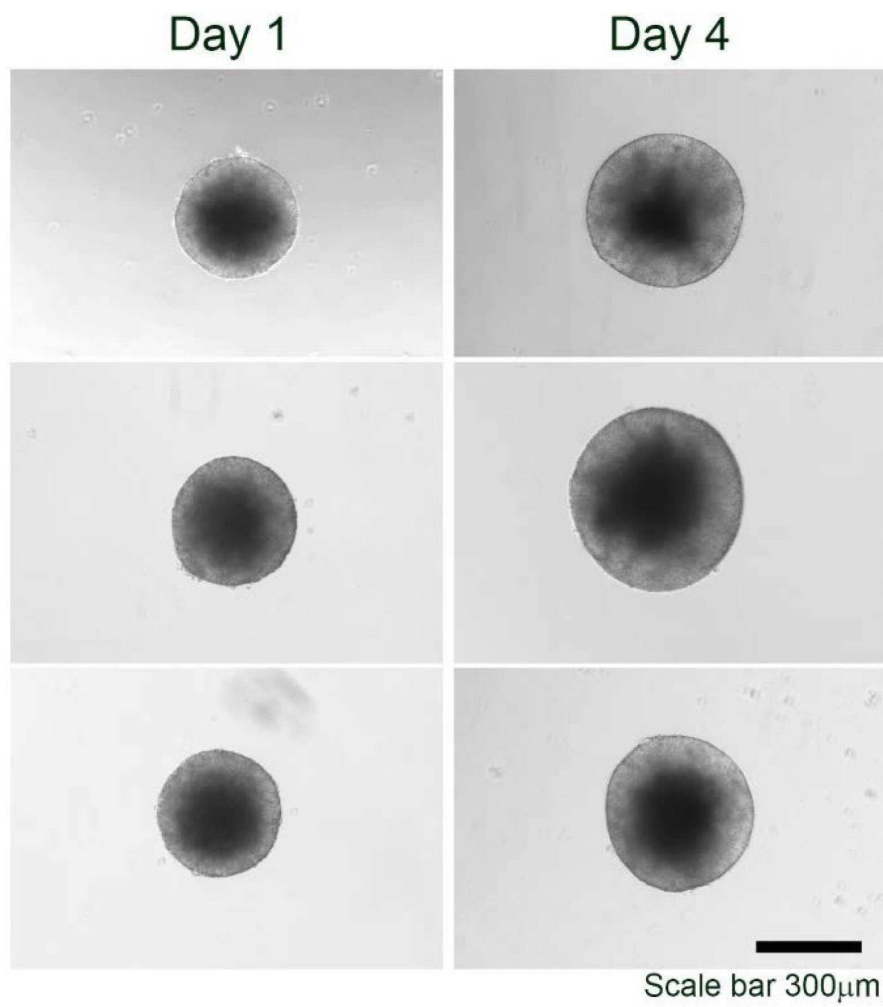
도면1



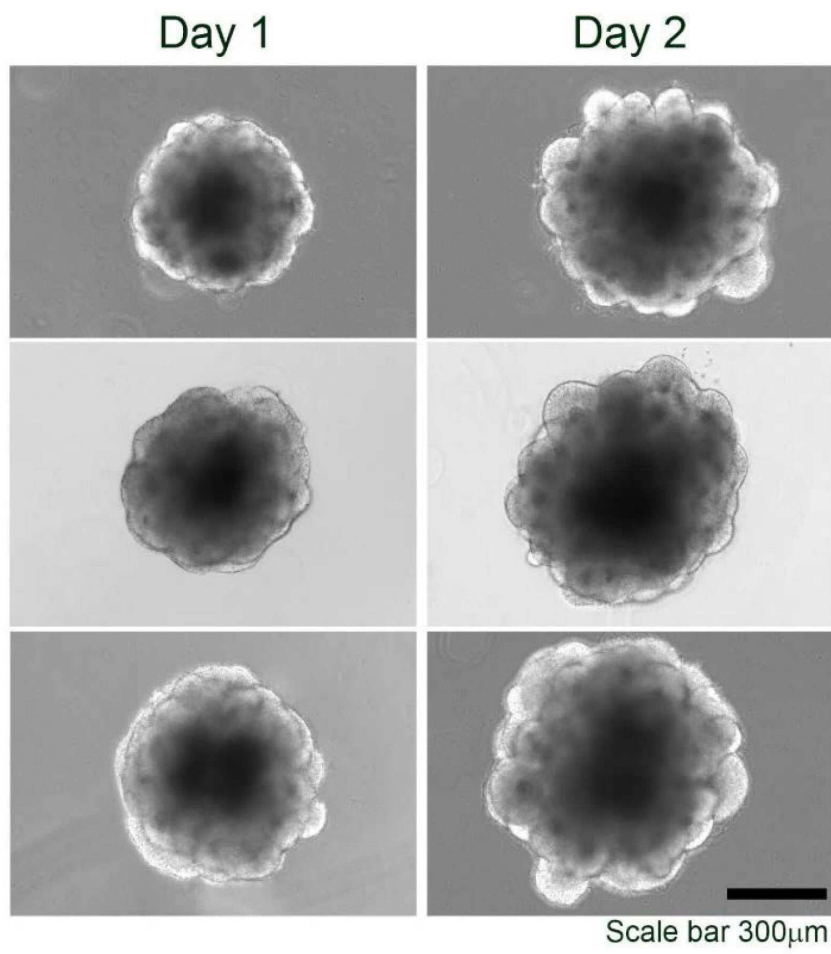
도면2



도면3



도면4



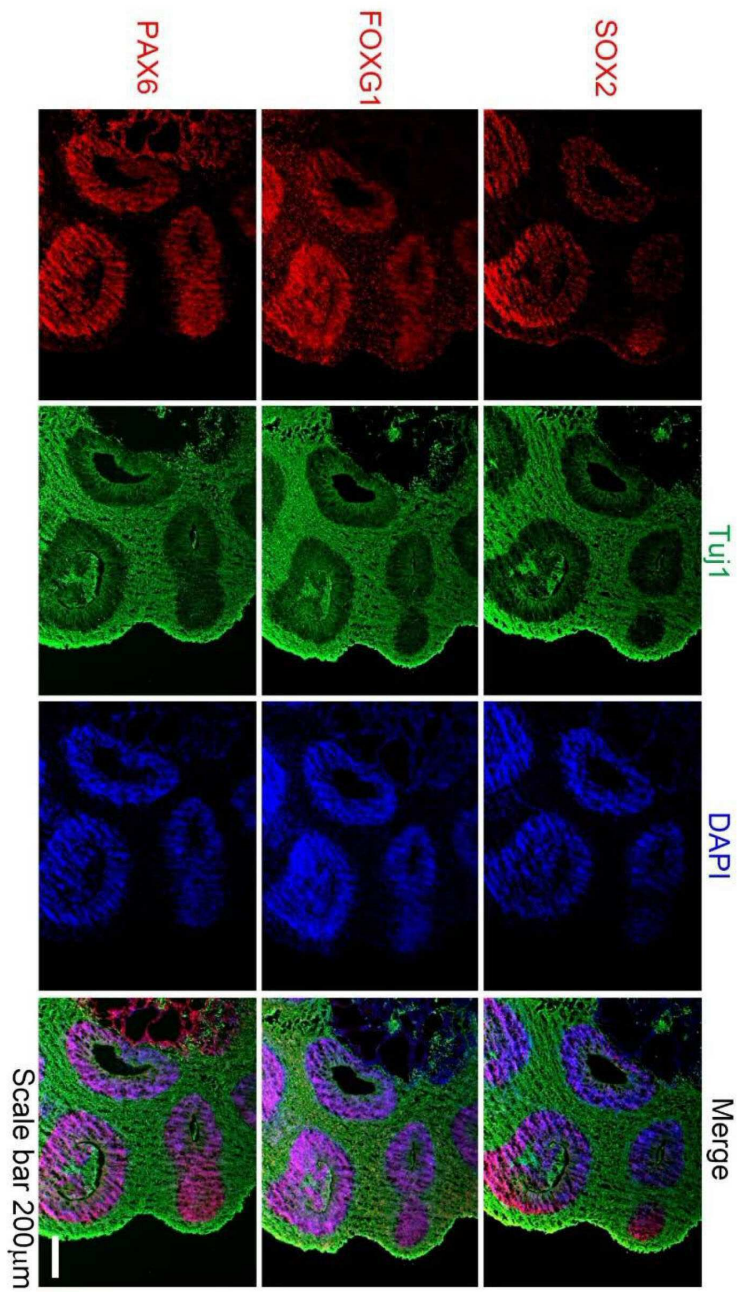
도면5



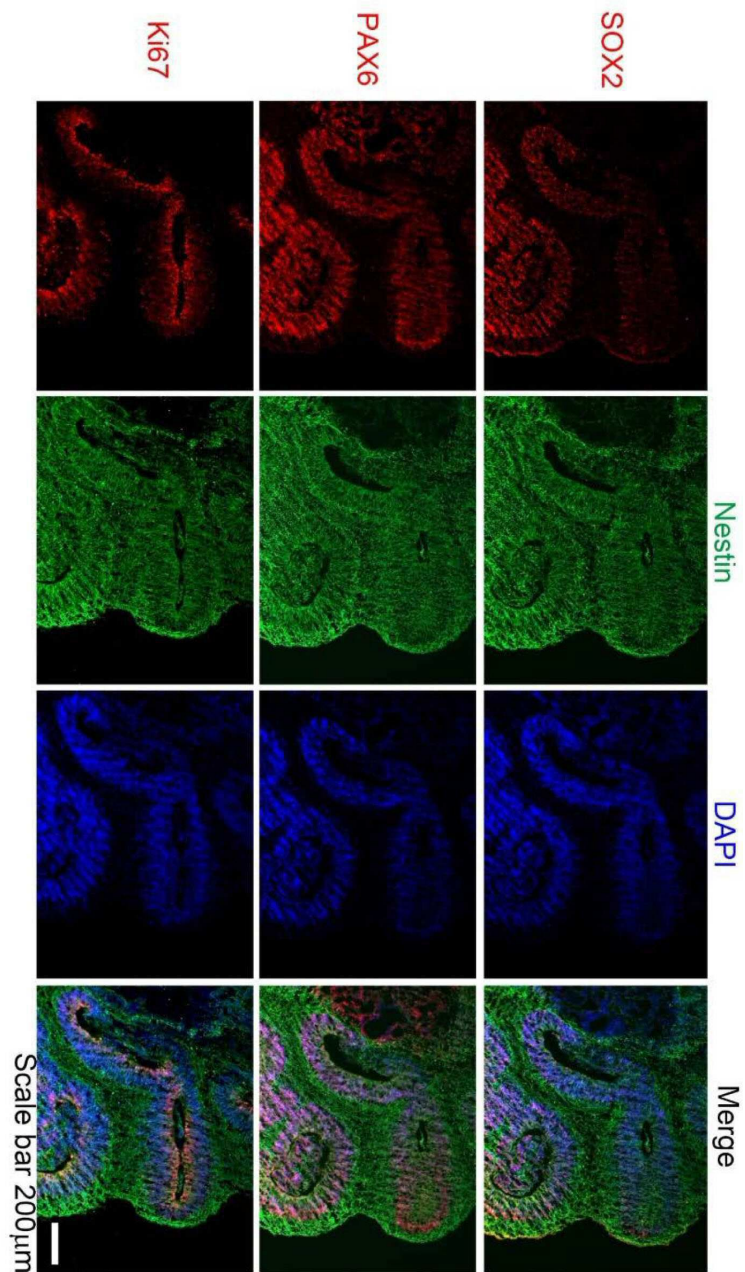
도면6



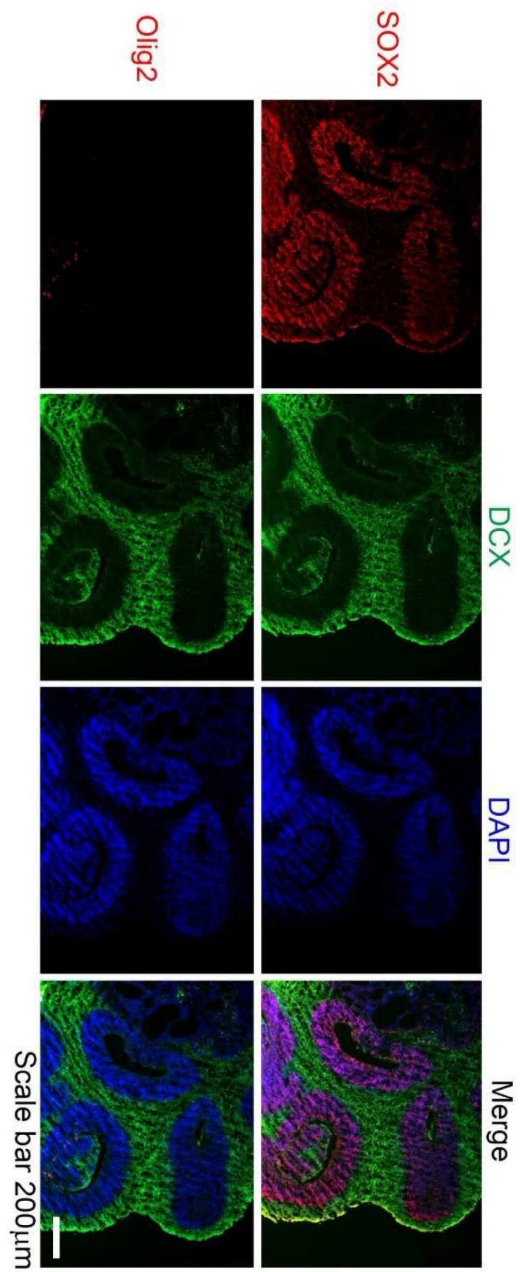
도면7



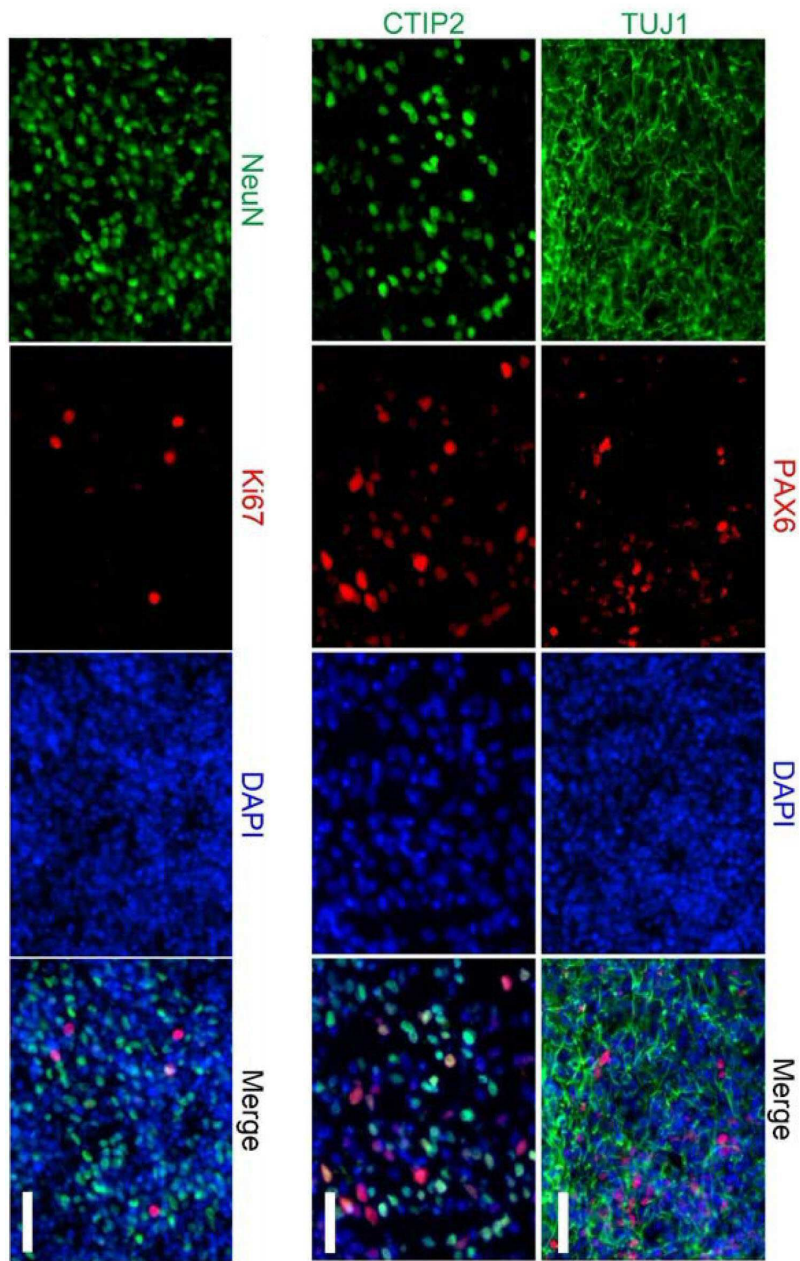
도면8



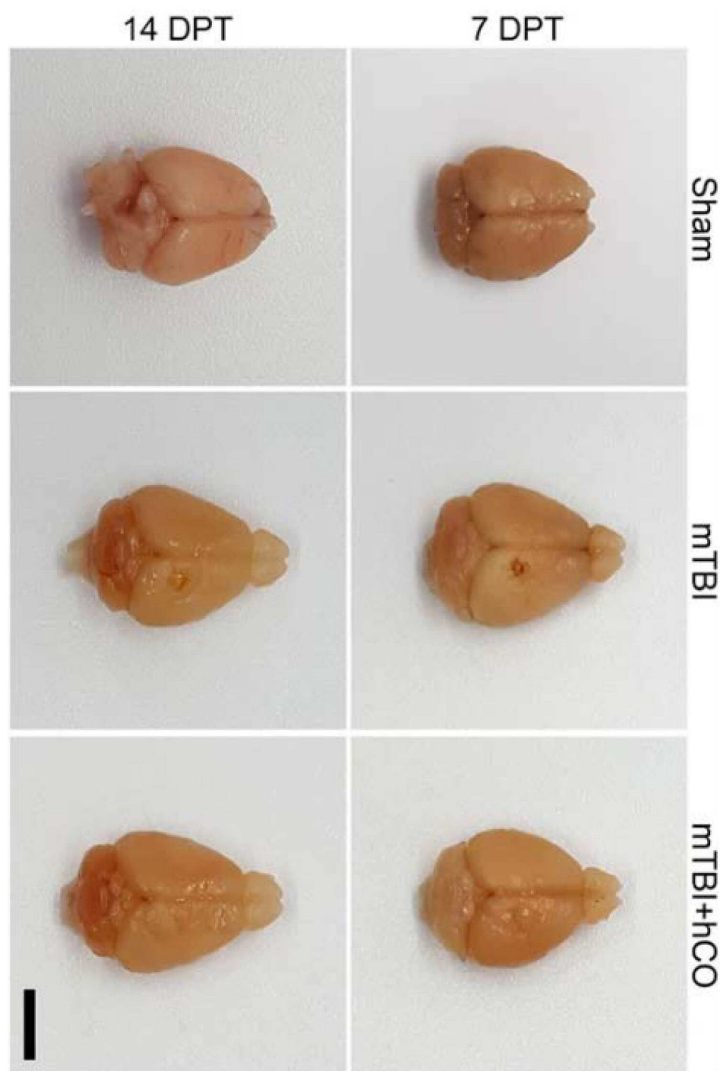
도면9



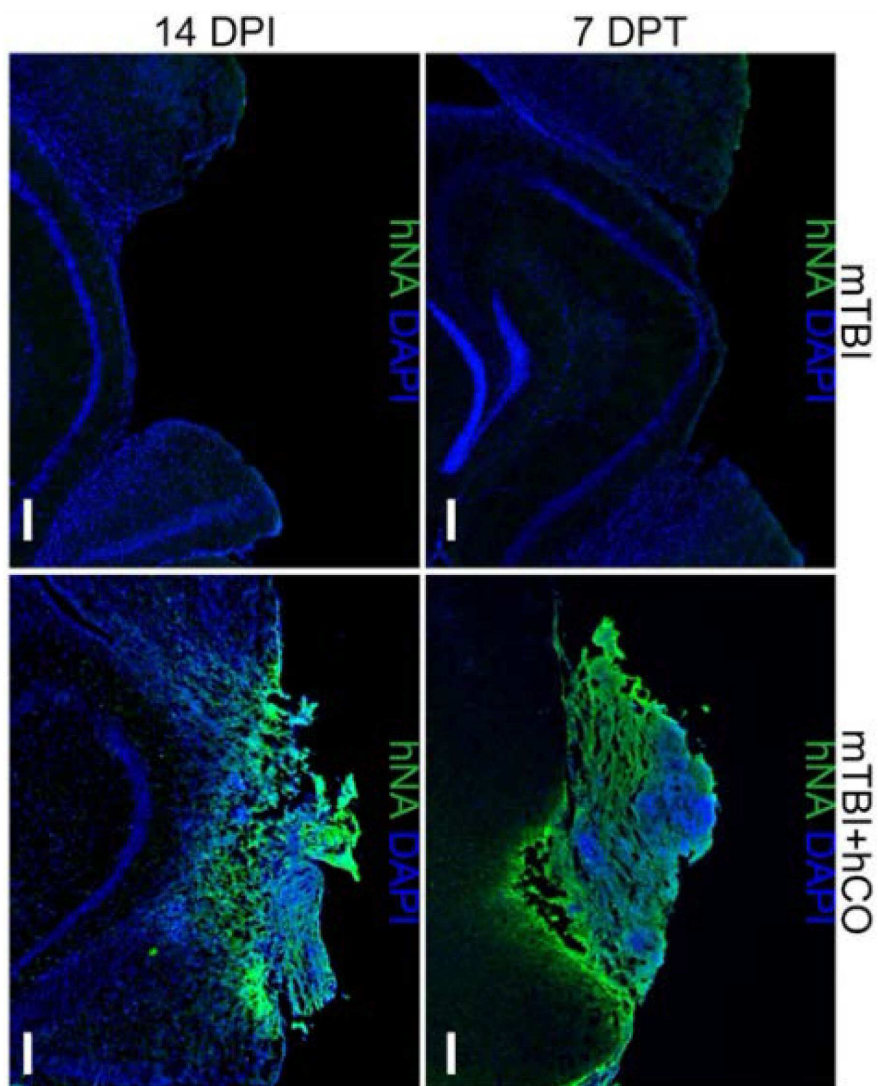
도면10



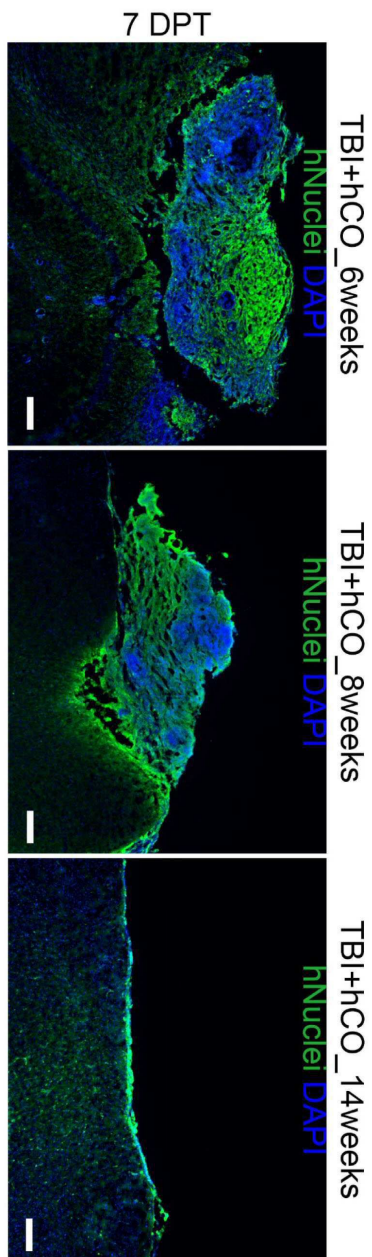
도면11



도면12



도면13



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.